



L'endoderme viscéral, spécification et rôle dans la survie de l'embryon de souris avant la gastrulation

**Michaël Reber
Elena Barbacci
Silvia Cereghini**

Inserm U. 423, Hôpital Necker-Enfants Malades, Tour Lavoisier, 6^e étage, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

► *variant hepatocyte nuclear factor 1* (vHNF1) est un facteur de transcription à homéodomaine appartenant à une famille hétérogène impliquée dans le développement précoce et dans le métabolisme. L'invalidation de ce gène induit une létalité embryonnaire précoce, conséquence de l'absence d'endoderme viscéral. Ce tissu, d'origine extra-embryonnaire, est indispensable pour la nutrition de l'embryon, mais aussi pour la régionalisation du neurectoderme et la formation de la cavité pro-amniotique. vHNF1 se place dans une position prééminente au sein du réseau complexe de régulation contrôlant la spécification et la différenciation de l'endoderme viscéral. La létalité embryonnaire précoce ne permet pas d'étudier un éventuel plus tardif rôle de vHNF1, notamment pendant l'organogenèse. Des mutations de *vHnf1* chez l'homme entraînent des dysfonctionnements du pancréas et des anomalies du développement urogénital pour l'étude desquelles d'autres stratégies, seront nécessaires. ◀

VHNF1 (*variant hepatocyte nuclear factor 1*, appartient à la famille d'homéoprotéines HNF (*hepatocyte nuclear factors*), qui inclut HNF-1, HNF-3 α , β et γ , HNF-4, et HNF-6 et C/EBP (*Tableau I*) [1]. vHNF1 et HNF1, structurellement analogues, fonctionnent comme des activateurs transcriptionnels et forment des homodimères et des hétérodimères *in vivo* et *in vitro* par l'intermédiaire d'un domaine de dimérisation amino-terminal. Ils possèdent la même spécificité de liaison à l'ADN et interagissent avec des éléments de régulation présents dans les promoteurs et/ou les activateurs d'un grand nombre de gènes exprimés entre autres dans le foie, le rein et le pancréas. L'expression de *vHnf1* précède systématiquement celle de *Hnf1* dans les organes où ces deux gènes sont coexprimés. De plus, la distribution tissulaire de vHNF1 est plus large que celle de HNF1 (*Tableau I*) [2]. Récemment, différentes mutations dans *vHnf1* ont été identifiées chez l'homme. Elles provoquent des anomalies du développement rénal, cause de néphropathies de sévérité variable. Dans certains cas, ces mutations hétérozygotes sont aussi asso-

ciées à des anomalies du tractus génital et à une forme de diabète non-insulinodépendant, MODY (*maturity onset diabetes of the young*), qui se manifeste à l'adolescence. L'invalidation du gène *vHnf1* chez la souris, et la substitution du premier exon de *vHnf1* par le gène rapporteur *lacZ* et le gène de sélection conférant la résistance à la néomycine a permis, à l'état hétérozygote, d'établir le profil d'expression de *vHnf1* par coloration histochimique (*figure 1*), mais aussi et surtout, d'analyser, à l'état homozygote, l'effet de l'absence de *vHnf1* [5].

vHnf1 s'exprime dès E4,5 dans l'endoderme primitif et ses dérivés, l'endoderme viscéral et pariétal

Au stade de blastocyste (E3,5), on identifie un type cellulaire différencié, le trophoctoderme, et la masse cellulaire interne, indifférenciée. Dès E4,5, la masse cellulaire interne commence à se différencier pour former l'ectoderme primitif recouvert par l'endoderme primitif qui fait face au blastocœle. L'endoderme primitif, présent seulement transitoirement, se différencie alors en endoderme viscéral, entourant l'ectoderme primitif, et

Tableau I

LES DIFFÉRENTS FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE « HNF »

Facteurs (domaine de liaison à l'ADN) Phénotype des souris homozygotes mutantes	Sites d'expression au cours de l'embryogenèse et chez l'adulte
HNF1 (homéodomaine atypique) HNF1 Homozygotes viables, cachexie, hépatomégalie, dysfonctionnements rénaux [13].	Sac vitellin (dès E8,0). Rein, foie, pancréas, intestin.
vHNF1 Létalité embryonnaire entre E6,0 et E6,25. Absence d'endoderme viscéral [5].	Endoderme primitif (dès E4,5). Tube neural (de E8,0 à E11,0). Intestin primitif et dérivés (poumon, foie). pancréas, intestin, estomac), rein, gonade.
HNF-3 (<i>Winged helix</i>) HNF-3 α Homozygotes viables, retard de croissance, hypoglycémie, diminution de l'expression de proglucagon pancréatique [14-15].	Endoderme définitif, nœud. Notocorde, plancher du tube neural. Poumon, foie, estomac, pancréas, intestin.
HNF-3 β Létalité embryonnaire entre E6,5 et E9,5, absence de nœud et de notocorde [16-17].	Endoderme définitif, nœud, plancher du tube neural. Poumon, foie, estomac, pancréas, intestin postérieur.
HNF-3 γ Homozygotes viables, diminution de l'expression de certains gènes hépatiques [18].	Endoderme définitif, intestin primitif. Foie, pancréas, estomac, intestin, gonade.
HNF-4 (doigt de zinc) HNF-4 α 1 Létalité embryonnaire à E7,5. Apoptose de l'ectoderme dû à un défaut de maturation de l'endoderme viscéral [19].	Endoderme viscéral, intestin primitif. Foie, pancréas, intestin, estomac et rein.
HNF-6 (homéodomaine <i>Cut</i>) HNF-6 absence de données.	Foie embryonnaire. Foie, pancréas, cerveau, tube neural [19].

en endoderme pariétal, composé de cellules qui migrent dans le blastocœle le long du trophoctoderme (E5,5) et sécrètent les composants de la membrane de Reichert (E5,5). Ces deux tissus endodermiques appartiennent aux annexes extra-embryonnaires et ne participent pas à la structure de l'embryon proprement dit. Avant la formation d'un placenta fonctionnel, ils ont une fonction de transport et de filtration des nutriments d'origine maternelle. Hormis cette fonction, l'endoderme viscéral est important pour la mise en place de l'axe antéro-postérieur de l'embryon avant la gastrulation

[6] (*m/s 1994, n° 1, p. 84*), et dans la formation de la cavité proamniotique, qui fait intervenir un processus d'apoptose [7]. *vHnf1* est exprimé très précocement dans l'endoderme primitif, à E4,5, puis dans ses dérivés, l'endoderme viscéral et pariétal. A ce stade, *vHnf1* ne s'exprime que dans les annexes extra-embryonnaires, la première expression embryonnaire du gène n'étant détectée qu'à E8,5 dans l'endoderme définitif, et de manière transitoire dans le tube neural. L'endoderme définitif, qui dérive de l'ectoderme primitif, donne naissance aux organes tels que le foie, le pancréas, l'estomac,

l'intestin. *vHnf1* est exprimé dans ces organes précocement au cours de l'organogenèse, ainsi que dans le mésonéphros et le métanéphros (*figure 1*).

A ce jour, seuls quelques facteurs de transcription ont été détectés dans l'endoderme primitif. Ces facteurs, notamment *HNF-4*, se sont avérés nécessaires au développement et à la survie de l'embryon [8]. La présence plutôt inattendue de vHNF1 dans ce tissu suggérait un rôle crucial de ce facteur pour le développement précoce de l'embryon, ce que confirme l'analyse des souris *nulles* pour ce gène.

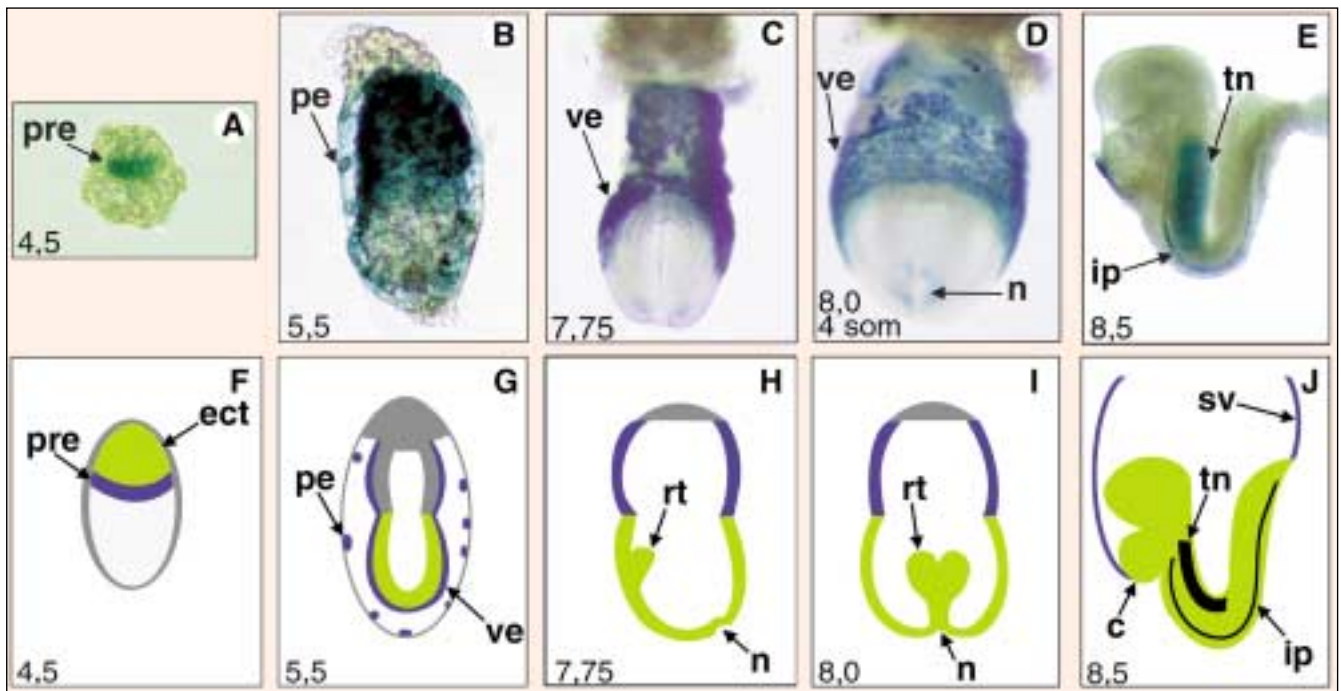


Figure 1. **Analyse du profil d'expression de la β -galactosidase dans les embryons hétérozygotes $vHnf1^{+/-}$.** **A.** Expression dans l'endoderme primitif (pre) au stade blastocyste E4,5. **B-C.** Expression dans l'endoderme pariétal (pe) et viscéral (ve) entourant l'ectoderme primitif à E5,5 et l'ectoderme extra-embryonnaire à E7,75 (vue frontale). **D.** Expression dans l'endoderme viscéral et dans des cellules entourant le nœud (n) à E8,0 (vue frontale). **E.** Expression dans le tube neural (tn) et dans l'intestin primitif (ip) à E8,5. **F-J.** Schéma représentatif des stades précoces étudiés au cours du développement de l'embryon de souris. En bleu : l'endoderme primitif et ses dérivés ; en vert : l'ectoderme (ect) (rt: repli de la tête; sv: sac vitellin; c: cœur; H: vue latérale; I: vue frontale).

La mutation homozygote de $vHnf1$ est létale avant la gastrulation par absence d'endoderme viscéral

L'absence de $vHnf1$ est létale précocement. Les embryons mutants homozygotes sont viables jusqu'au stade du blastocyste, mais meurent entre E6,0 et E6,5 juste après l'implantation et avant la gastrulation. La croissance des embryons mutants est très ralentie et les tissus extra-embryonnaires sont mal définis. L'ectoderme embryonnaire semble très désorganisé et la cavité proamniotique n'est pas formée (figure 2). A ce stade, l'endoderme viscéral, qui normalement est formé d'un épithélium continu, squameux dans sa partie embryonnaire et en colonne dans sa partie extra-embryonnaire, est inexistant dans les embryons $vHnf1^{-/-}$. Récemment, il a été démontré que certains facteurs de transcription, en particulier HNF-4 [8] et GATA-6 [9] présents dans l'endoderme viscéral,

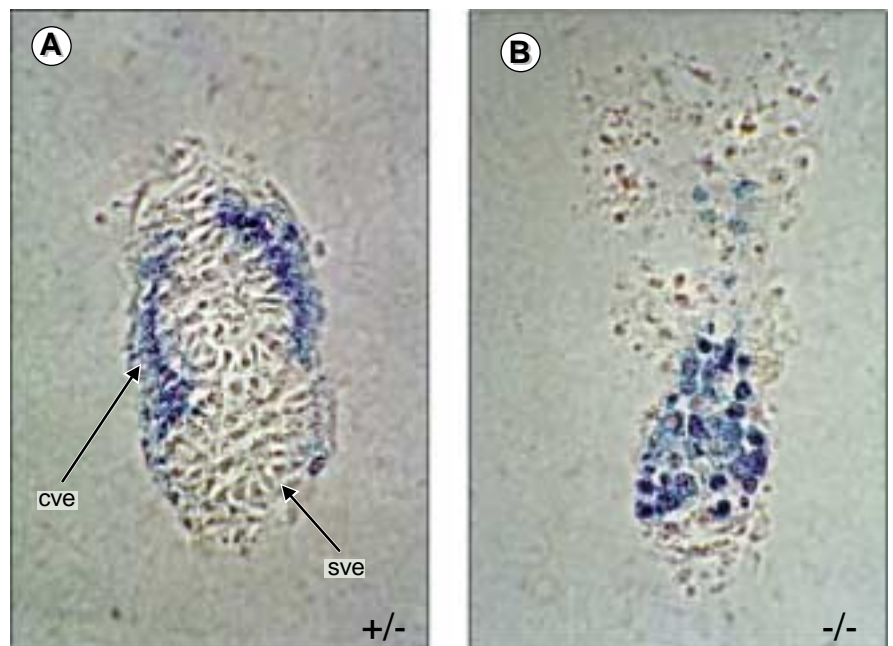


Figure 2. **Expression de l'activité β -galactosidase dans l'endoderme viscéral des embryons $vHnf1^{+/-}$ et $vHnf1^{-/-}$.** **A.** Coupe sagittale d'un embryon $vHnf1^{+/-}$ révélant l'expression de $vHnf1$ dans l'endoderme viscéral extra-embryonnaire (cve) et embryonnaire (sve). **B.** Coupe sagittale d'un embryon $vHnf1^{-/-}$ révélant un retard de croissance et l'absence d'endoderme viscéral.

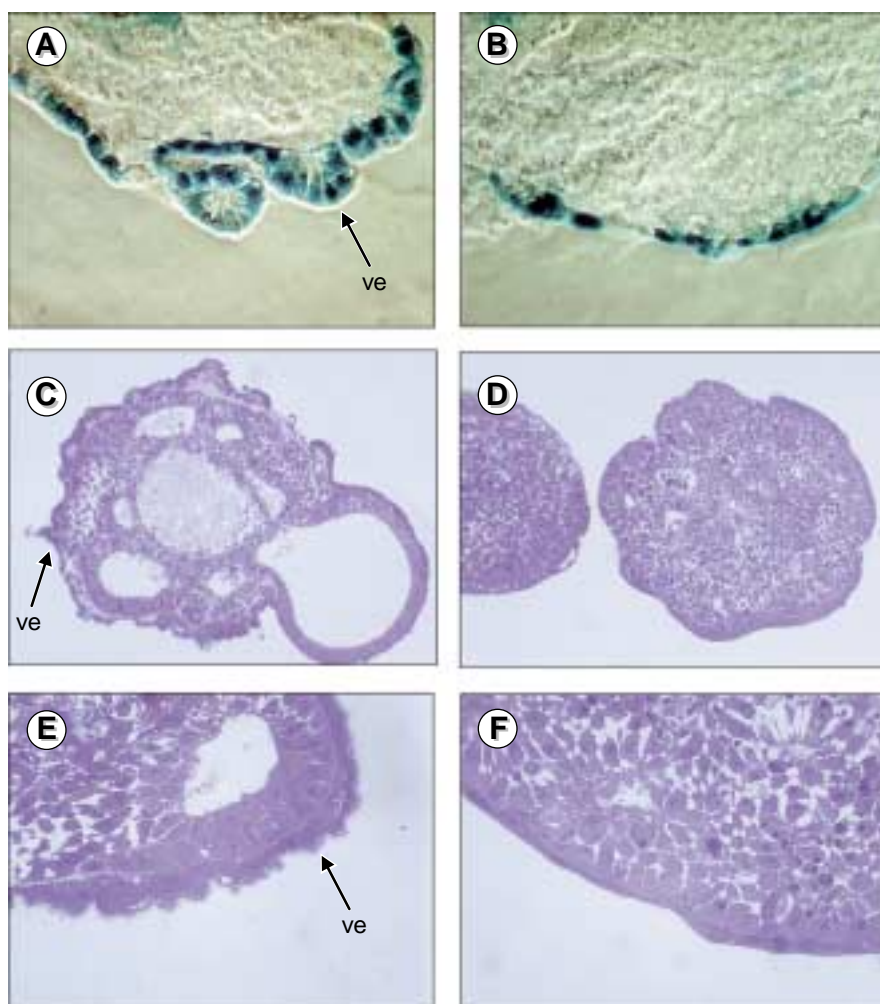


Figure 3. **Morphologie et structure de corps embryoides hétérozygotes et homozygotes après 7 jours de culture.** **A.** Expression de la β -galactosidase dans l'endoderme viscéral (ve) des corps embryoides $vHnf1^{+/-}$. **B.** Expression de la β -galactosidase dans les corps embryoides $vHnf1^{-/-}$ révélant des cellules plates et désorganisées. **C, E.** Coupe semi-fine de corps embryoides $vHnf1^{+/-}$. **D, F.** Coupe semi-fine de corps embryoides $vHnf1^{-/-}$ révélant l'absence de cavités et d'endoderme viscéral.

sont nécessaires à sa différenciation. En leur absence, il y a une apoptose de l'ectoderme embryonnaire après la gastrulation, létale entre E7,0-E7,5. Le profil d'expression de $vHnf1$, et l'absence d'endoderme viscéral dans les embryons $vHnf1^{-/-}$ homozygotes mutants, étaient très suggestifs de la participation de ce gène à la formation et/ou la différenciation de l'endoderme viscéral. Différentes approches expérimentales, notamment l'analyse de la différenciation de cellules ES (*embryonic stem cells*) (*m/s* 1992, n°3, p. 268) $vHnf1^{+/-}$ et celle des chimères d'agrégation tétraploïde ont

permis de préciser la fonction de ce gène au cours du développement post-implantatoire.

Les cellules ES cultivées *in vitro* en l'absence de LIF (*leukemia inhibiting factor*) [10] se différencient spontanément en corps embryoides kystiques, composés d'une couche externe d'endoderme viscéral faite de cellules épithéliales vacuolisées avec d'importantes microvillosités et d'une couche interne de cellules ectodermiques. Ces structures complexes calquent le développement précoce de l'embryon de souris jusqu'au stade œuf cylindre [11]. Les corps embryoides issus des

cellules ES $vHnf1^{+/-}$ ne forment pas de couche d'endoderme viscéral. Au contraire on observe des cellules indifférenciées, aplaties et désorganisées (figure 3), et les corps embryoides ne sont pas kystiques. Argument supplémentaire, les marqueurs précoces et tardifs de l'endoderme viscéral ne sont pas exprimés. Les données *in vitro* sont en accord avec les observations *in vivo* d'un endoderme viscéral défectueux ou absent dans les embryons $vHnf1^{-/-}$. Qui plus est, en l'absence de $vHnf1$, certains gènes de la famille des HNF, en particulier $Hnf-4\alpha$, $Hnf1$, $Hnf3\gamma$ et $Hnf-6$, intervenant normalement dans le contrôle de la formation de l'endoderme, ne sont pas exprimés, indiquant qu'ils sont sous le contrôle, direct ou indirect, de $vHNF1$. Comme on pouvait s'y attendre, les protéines synthétisées dans l'endoderme viscéral par les différents gènes cibles de $vHNF1$ et de $HNF-4\alpha$, notamment l'albumine, l' α 1-antitrypsine et l' α -fœtoprotéine, sont indétectables dans les corps embryoides $vHnf1^{-/-}$. Le rôle prééminent de $vHNF1$ parmi les protéines qui contrôlent le développement de l'endoderme (figure 4) est aussi attesté par la sévérité du phénotype $vHnf1^{-/-}$, comparé à celle, plus modérée, des embryons $Hnf-4\alpha^{-/-}$. Ces différences suggèrent qu'en plus du contrôle de l'expression de ce gène, $vHNF1$ participerait aussi à la régulation de l'expression d'autres molécules impliqués dans le développement précoce.

Pour démontrer que l'absence d'endoderme viscéral est bien responsable de la létalité précoce des embryons mutants homozygotes, des embryons tétraploïdes ont été produits en agréant des cellules ES $vHnf1^{-/-}$ avec des embryons tétraploïdes sauvages. Dans ces conditions, la partie embryonnaire est issue des cellules ES mutantes alors que les annexes extra-embryonnaires dérivent exclusivement des cellules tétraploïdes sauvages [12]. Les embryons homozygotes mutants obtenus par cette technique n'ont aucune altération morphologique évidente jusqu'à E9,5. A ce stade, des signes de nécrose apparaissent au niveau de la fermeture du tube neural dans sa partie antérieure et postérieure, défauts qui ne sont pas observés dans les embryons hétérozygotes témoins.

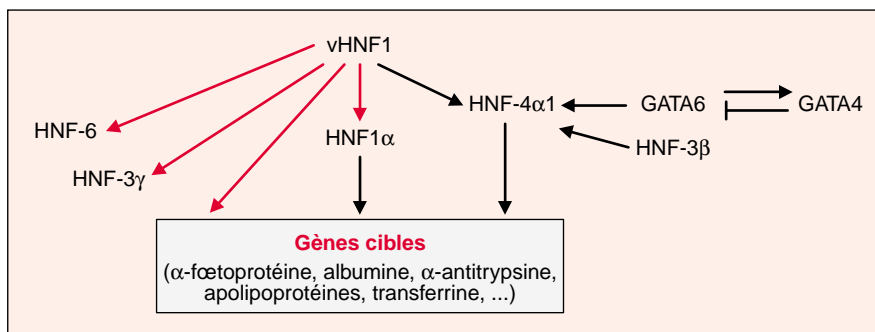


Figure 4. **Modèle du réseau de facteurs de transcription réglant la différenciation de l'endoderme viscéral.** Plus qu'une cascade hiérarchique linéaire, nos résultats intégrés aux différents travaux sur la différenciation de l'endoderme viscéral suggèrent un réseau complexe de régulation croisée gouvernant la formation de ce tissu.

Conclusions

L'ensemble de ces données confirme sans ambiguïté que l'absence d'endoderme viscéral est bien responsable de la létalité précoce observée chez les embryons homozygotes *vHnf1*^{-/-}. Ces données révèlent aussi le rôle fondamental de l'endoderme viscéral dans la survie de l'embryon juste après implantation, et donnent à vHNF1 une place prédominante parmi les facteurs de régulation impliqués dans la spécification de l'endoderme viscéral. Il reste maintenant à disséquer les interactions moléculaires intervenant dans la différenciation de l'endoderme viscéral qui mettent en jeu non seulement les protéines HNF (vHNF1, HNF-4α), mais aussi d'autres facteurs comme les protéines GATA (GATA-4, GATA-6) ■

Remerciements

Ce travail a été subventionné par l'ARC, l'Inserm et la CEE. Les auteurs remercient vivement Marie-Odile Ott, François Huetz, Mireille Sich et Christelle Breillat pour leur participation à ce travail et pour leurs encouragements.

RÉFÉRENCES

1. Cereghini S. Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *Faseb J* 1996; 10: 267-82.
2. Cereghini S, Ott MO, Power S, Maury M. Expression patterns of vHNF1 and HNF1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles. *Development* 1992; 116: 783-97.
3. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, et al. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 1997; 17: 384-5.
4. Lindner TH, Njolstad PR, Horikawa Y, Bostad L, Bell GI, Sovik O. A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 2001-8.
5. Barbacci E, Reber M, Ott M, Breillat C, Huetz F, Cereghini S. Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* 1999; 126: 4795-805.
6. Beddington RS, Robertson EJ. Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 1999; 96: 195-209.
7. Coucouvanis E, Martin GR. BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development* 1999; 126: 535-46.
8. Chen WS, Manova K, Weinstein DC, et al. Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev* 1994; 8: 2466-77.
9. Morrisey EE, Tang Z, Sigrist K, Lu MM, Jiang F, Ip HS, Parmacek MS. GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev* 1998; 12: 3579-90.
10. Loubet M, Fiszman MY. Les cellules souches embryonnaires: un modèle cellulaire pour l'étude de la différenciation cardiaque normale et pathologique. *Med Sci* 1998; 14: 1072-6.
11. Robertson EJ. Embryo-derived stem cell lines. In: Robertson EJ, ed. *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1987: 71-112.
12. Nagy A, Rossant J. Production of completely ES cell-derived fetuses. In: Joyner, AL, ed. *Gene targeting: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1993: 147-79.
13. Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, et al. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 1996; 84: 575-85.
14. Shih DQ, Navas MA, Kuwajima S, Duncan SA, Stoffel M. Impaired glucose homeostasis and neonatal mortality in hepatocyte nuclear factor 3alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10152-7.
15. Kaestner KH, Katz J, Liu Y, Drucker D, Schutz G. Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3alpha affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression *in vivo*. *Genes Dev* 1999; 13: 495-504.
16. Ang SL, Rossant J. HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 1994; 78: 561-74.
17. Weinstein DC, Ruiz I, Altaba A, et al. The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 1994; 78: 575-88.
18. Kaestner KH, Hiemisch H, Schutz G. Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 4245-51.
19. Landry C, Clotman F, Hioki T, et al. HNF-6 is expressed in endoderm derivatives and nervous system of the mouse embryo and participates to the cross-regulatory network of liver-enriched transcription factors. *Dev Biol* 1997; 192: 247-57.

TIRÉS À PART

S. Cereghini.

ms2000

Summary

Visceral endoderm specification, role in the development of the pregastrulating embryo

Genetic and molecular evidence indicates that visceral endoderm, an extraembryonic lineage derived from primitive endoderm, is required for gastrulation, early anterior neural patterning, cell death and specification of posterior mesodermal cell fates. *vHNF1*, a homeodomain containing transcription factor belonging to the Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) family, is first expressed in the primitive endoderm and is required for early embryogenesis and plays an essential role in visceral endoderm specification. Homozygous mutant embryos die just after implantation and before gastrulation displaying growth retardation, disorganised ectoderm and absence of visceral endoderm. Homozygous null blastocysts and differentiated embryonic stem cells do not express early or late visceral endoderm markers. Aggregation of *vHnf1*-deficient embryonic stem cells with wild-type tetraploid embryos rescues the periimplantation lethality and allows development to progress to early organogenesis, confirming that the early embryonic lethal phenotype is essentially due to defective extraembryonic tissue formation. These results, together with observations of other mutations affecting visceral endoderm function, in particular *Hnf-4 α* , indicate that the specification of the visceral endoderm involves a complex regulatory network rather than a linear cascade.

FONDATION FYSSSEN

194, RUE DE RIVOLI - 75001 PARIS

TÉL. : 33 (0)1 42 97 53 16 - FAX: 33 (0)1 42 60 17 95

La FONDATION FYSSSEN a pour objectif général « de promouvoir sous toutes ses formes l'analyse scientifique des mécanismes logiques du comportement animal et humain ainsi que leur développement ontogénétique et phylogénétique ».

BOURSES D'ÉTUDES POST-DOCTORALES

La FONDATION FYSSSEN attribuera un certain nombre de **BOURSES D'ÉTUDES POST-DOCTORALES**.

Ces bourses doivent permettre la formation et le soutien de chercheurs de niveau post-doctoral travaillant dans des domaines de recherche qui répondent aux objectifs de la Fondation tels que l'éthologie, la paléontologie, l'archéologie, l'anthropologie, la psychologie, l'épistémologie, la logique et les sciences du système nerveux.

La Fondation souhaiterait soutenir plus particulièrement les recherches dans les domaines tels que :

ÉTHOLOGIE ET PSYCHOLOGIE : La nature et le développement des processus cognitifs chez l'homme et chez les animaux. Le déterminisme des comportements au cours de l'ontogenèse et leur évolution à travers la phylogenèse.

NEUROBIOLOGIE : Les études portant sur les bases neurobiologiques des processus cognitifs et de leur développement embryonnaire et post-natal ainsi que les mécanismes élémentaires qu'ils engagent.

ANTHROPOLOGIE-ETHNOLOGIE : L'étude :

- des systèmes de représentations des environnements naturels et des cultures. Analyse des principes de construction et des mécanismes de transmission de ces systèmes en mettant en évidence leurs aspects cognitifs ;
- des systèmes techniques développés dans les diverses formes d'organisation sociale et analysés sous tous leurs aspects (savoirs, savoir-faire, mécanismes de transmission).

PALÉONTOLOGIE HUMAINE - ARCHÉOLOGIE : L'origine et l'évolution du cerveau humain et de ses productions.

Ces bourses d'un montant maximum de 120 000 F annuel seront réservées à des chercheurs français désirant se rendre dans des laboratoires étrangers et à des chercheurs étrangers venant travailler dans des laboratoires français. Elles s'adressent aux jeunes chercheurs, moins de 35 ans, et sont normalement d'une durée maximale d'un an ; elles peuvent éventuellement être renouvelées.

Les demandes de bourses doivent être établies suivant un formulaire à demander à la Fondation de Septembre à Février. Les dossiers complets doivent être adressés en **15 exemplaires** au Secrétariat de la Fondation, 194, rue de Rivoli, 75001 PARIS.

Date limite impérative de réception des dossiers : le 31 mars 2000.

Seules seront prises en considération les demandes de bourses qui entrent explicitement dans les objectifs de la Fondation.

PRIX INTERNATIONAL

Un PRIX INTERNATIONAL de 200 000 F est attribué à un chercheur qui s'est distingué par une activité de recherche fondamentale qui correspond, directement, ou indirectement à l'objectif de la Fondation et qui concerne des disciplines telles que l'éthologie, la paléontologie, l'archéologie, l'anthropologie, la psychologie, l'épistémologie, la logique et les sciences du système nerveux. Il a été décerné à MM. les Professeurs A. LEROI-GOURHAN (1980), W.H. THORPE (1981), V.P. MOUNTCASTLE (1982), H.C. CONKLIN (1983), R.W. BROWN (1984), P. BUSER (1985), D. PILBEAM (1986), D. PREMACK (1987), J.C. GARDIN (1988), P.S. GOLDMAN-RAKIC (1989), J. GOODY (1990), G.A. MILLER (1991), P. RAKIC (1992), L.L. CAVALLI-SFORZA (1993), L.R. GLEITMAN (1994), W.D. HAMILTON (1995), C. RENFREW (1996), M. JOUVET (1997) et A. WALKER (1998).

Discipline pour le Prix International 2000 :

« INTENTIONNALITÉ ET PLANIFICATION DE L'ACTION »

Les propositions de candidature doivent comporter :

- le curriculum vitæ,
- la **liste** des publications du candidat,
- un résumé (quatre pages maximum) du travail de recherche qui justifie l'attribution du Prix.

On ne peut se porter directement candidat. La candidature doit impérativement être présentée par une personnalité scientifique reconnue et être adressée en **15 exemplaires** au Secrétariat de la Fondation, 194, rue de Rivoli, 75001 PARIS.

Date limite des propositions de candidature : le 31 OCTOBRE 2000.